

Rec'd PCT/PTO 11 FEB 2005

PCT/JP03/10117

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.08.03

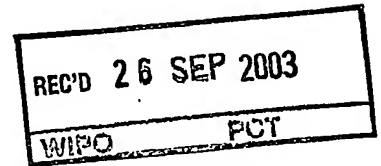
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月13日

出願番号
Application Number: 特願2002-235697
[ST. 10/C]: [JP2002-235697]

出願人
Applicant(s): グンゼ株式会社
科学技術振興事業団

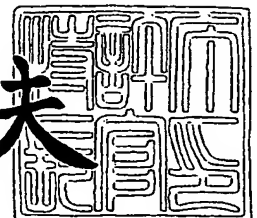


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3074610

【書類名】 特許願

【整理番号】 26402JP

【提出日】 平成14年 8月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県守山市森川原町 1 6 3 番地 グンゼ株式会社研究
開発センター内

【氏名】 円尾 正晴

【特許出願人】

【識別番号】 000001339

【氏名又は名称】 グンゼ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706768

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオセンサの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた作用極と参照極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素、電子受容体および微細結晶セルロース粉体を含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系が前記電極系上およびその近傍に、単独又は複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、

前記反応層を形成する工程が、

- (1) 前記反応試薬系を前記反応試薬系の良溶媒に加え、溶液 A を作成する工程
 - (2) 前記溶液 A を前記反応試薬系の貧溶媒に混合し、懸濁液 B を作成する工程
 - (3) 前記懸濁液 B を電極系の所定部分に供給した後、乾燥して電極系の所定部分に反応層を密着固定する工程
- を含むバイオセンサの製造方法。

【請求項 2】 電極系が、白金、金、パラジウム、インジウム - スズ酸化物からなる群から選ばれる少なくとも 1 つからなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 請求項 1 及び 2 のいずれか 1 項に記載の方法により製造されたバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分について迅速かつ高精度な定量分析を実施するためのバイオセンサ、特にその反応層の形成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、試料中の特性成分について試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡便に定量しうる方式として、次のようなバイオセンサが開示されている。

【0003】

特開平 3-202764 には、反応層に親水性高分子を添加する方法が開示さ

れている。特開平3-202764に記載のグルコースセンサにおいて、フェリシアン化カリウムは、長手方向の大きさが1 mm以上の針状になって析出するため、得られる反応層の形状を不均一なものとし、センサの測定精度を悪化させる原因になっていた。

【0004】

特開2001-311712には、反応層に微細セルロース粉体または微細結晶セルロースを添加する方法が開示されている。特開2001-311712に記載の酵素センサにおいて、反応層膜厚を均一化し、センサチップの精度向上やチップ個体間の性能安定化に寄与するが、試料への溶解性が悪く、十分に溶解し混合するのが遅く結果として測定に時間がかかるという問題があった。その原因の一つとして、ヘキサシアノ鉄(III)カリウムの結晶が大きく成長し反応層の表面が試料と接する面積が小さいために分散および溶解しにくいことが考えられる。

【0005】

特開2001-281202には、反応層を昇華法により形成する方法が開示されている。特開2001-281202に記載のバイオセンサにおいて、その製造過程で減圧させる必要があるので設備などに費用がかかり、製造に向いていない。また、作業が繁雑になるため生産性も低い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は、試料中の特定成分について迅速かつ高精度な定量分析を実施するためのバイオセンサ、及び大がかりな装置を必要とせずにその反応層を得ることを主な課題とする。

【0007】

また、本発明は、バイオセンサのセンサチップ反応部の試料への溶解性向上による測定時間短縮および測定精度の向上も課題の1つとする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明は、バイオセンサ反応層の結晶性化合物を微粒子化し、分散溶

解性を上げることで反応時間の短縮を図った。

【0 0 0 9】

本発明は、以下の項 1 ～ 3 のバイオセンサおよびその製造方法に関する。

項 1. 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた作用極と参照極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素、電子受容体を含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系が前記電極系上または近傍に、単独又は複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、

前記反応層を形成する工程が、

- (1) 前記反応試薬系を前記反応試薬系の良溶媒に加え、溶液 A を作成する工程
- (2) 前記溶液 A を前記反応試薬系の貧溶媒に混合し、懸濁液 B を作成する工程
- (3) 前記懸濁液 B を電極系の所定部分に供給した後、乾燥して電極系の所定部分に反応層を密着固定する工程

を含むバイオセンサの製造方法。

項 2. 電極系が、白金、金、パラジウム、インジウム - スズ酸化物からなる群から選ばれる少なくとも 1 つからなる、項 1 に記載の方法。

項 3. 項 1 及び 2 のいずれか 1 項に記載の方法により製造されたバイオセンサ。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた作用極と参照極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素、電子受容体を含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系が前記電極系上または近傍に、単独又は複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法に関する。

【0 0 1 1】

本発明において、顔料化技術である析出法を利用し、微細結晶の反応層を得る。つまり、本発明における反応層を形成する工程は、次のような工程を含む：

- (1) 前記反応試薬系を前記反応試薬系の良溶媒に加え、溶液 A を作成する工程
- (2) 前記溶液 A を前記反応試薬系の貧溶媒に混合し、懸濁液 B を作成する工程
- (3) 前記懸濁液 B を電極系の所定部分に供給した後、乾燥して電極系の所定部

分に反応層を密着固定する工程。

【0012】

上記方法により作られた反応層は、ほぼ均一な微細結晶であるため、反応層の試料液に対する分散溶解性において優れている。

【0013】

上記析出法により析出する速度が大きいほど、より微細な反応層が得られる。従って、上記工程（3）における乾燥を考慮すると、良溶媒及び貧溶媒の沸点が互いに近いものを選択することが好ましい。

【0014】

本発明による反応試薬系の良溶媒とは、酸化還元酵素および電子受容体の溶解度の高い溶媒であれば良く、水又は含水溶媒が好ましい。含水溶媒は、水と相溶性のあるもの、例えばメタノール、エタノール、ジオキサン、イソプロピルアルコールなどと水の混合溶液である。

【0015】

本発明による反応試薬系の貧溶媒とは、水と溶けて、酸化還元酵素および電子受容体の溶解度を下げる溶媒であれば良く、アルキレングリコールモノアルキルエーテル、アルキレングリコール、プロピレンアルコール、ブタノールなどが挙げられ、エチレングリコールモノエチルエーテル（セロソルブ）が好ましい。

【0016】

上記工程（2）で生成する懸濁液B中に、反応試薬系が一部溶けていても良い。

【0017】

上記良溶媒と貧溶媒の組合せとして、水—エチレングリコールモノエチルエーテルが好ましい。また、良溶媒と貧溶媒の量の比は、1:0.5~10である。

【0018】

本発明における反応層は、例えば、良溶媒に前記反応試薬系を溶解させ、これを貧溶媒に滴下混合し、該混合液をピペット、ノズル等を用いて電極系の所定部分に塗布し、オープンなどに一定時間入れ乾燥させることにより作られる。

【0019】

本発明による反応試薬系は、少なくとも酸化還元酵素、電子受容体および微細結晶セルロース粉体を含む。

【0020】

反応試薬系が、微細結晶セルロース粉体を含むので、反応層作成における成膜性に優れる。

【0021】

本発明における酸化還元酵素は、測定対象となる被検成分に合わせた適当な酵素である。例えば、血糖値を測定する場合には、グルコース（基質）に対し特異性を有するグルコースオキシターゼを使用する。またアルコール値を測定する場合には、アルコールオキシターゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼを使用する。また乳酸を測定する場合には、乳酸オキシターゼ又は乳酸デヒドロゲナーゼを使用する。更に尿酸を測定する場合には、ウリカーゼを使用する。

【0022】

更に、一種類の酸化還元酵素で被検成分を測定できない場合や充分でない場合等には、二種類以上の異なる酸化還元酵素を混合して使用する。例えば、蔗糖を被検成分とする場合は、インベルターゼ、ムタローゼ、グルコースオキシターゼの三種類を混合して使用する。

【0023】

本発明における電子受容体は、酸化還元酵素と被検成分との反応に際して電子を授受し得る電子移動媒体として機能するものであり、酵素反応に悪影響を与えない限りその種類に制限はない。好ましい電子受容体は微細な粉末状であり、例えばフェリシアン化アルカリ金属の1つであるフェリシアン化カリウム、フェロセン又はそのアルキル置換体、フェナジンメトサルフェート、p-ベンゾキノン、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、 β -ナフトキノン4-スルホン酸カリウム等の酸化還元性の無機又は有機化合物などが挙げられる。

【0024】

本発明における微細結晶セルロース粉体は、直径約10 μ m以下で長さが300 μ m以下のものである。天然のセルロースであってもこの範囲のサイズであれ

ば、そのまま使用することもできるが、通常は微細化したものを使用する。

【0025】

本発明により微細化された電子受容体の大きさは、 $5\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ である。

【0026】

本発明における絶縁性の基板は、通常、機械的特性、耐薬品性、非吸水性等に優れるプラスチック、セラミックなどが挙げられる。プラスチックとしては、例えば、PET（ポリエチレンテレフタレート）、PEN（ポリエチレンナフタレート）などが挙げられる。

【0027】

本発明の1つの実施態様として、100%の水100 mLに対し、グルコースオキシダーゼ0.1～10 g、フェリシアン化カリウム5～70 g、微細結晶セルロース1～10 gの割合で溶液Aを作る。

【0028】

本発明における絶縁性基板上への電極系の形成方法として、次の方法が挙げられる：薄くて支持性があり、耐熱性に優れる、ポリイミドや芳香族ポリイミドなどのプラスチックのような電気絶縁性材料シート上に白金、金、パラジウム、インジウム - スズ酸化物などの導電性材料を蒸着あるいはスパッタリングする。該電気絶縁性材料シートの裏面にエチレン酢酸ビニルなどの熱融着材料をコーティングする。この多層シートを細断しテープ状にしたものを電極テープとする。熱融着性シートに、センサチップ反応部の電極面積を規制するような空孔を打ち抜いて、これをマスクシートとする。上記絶縁性基板に、前記電極テープ、前記マスクシートをこの順で熱接着する。このため、マスクシートと電極は熱に安定なものである。一定の厚みを持つ両面接着シートに試料吸入室を設けるような空孔を打ち抜いてスペーサシートとする。スペーサシートは下記カバーシートに対して粘着性があればよい。

【0029】

反応層を密着固定させる電極系の所定部分とは、基板上に熱接着された、上記電極テープ及びマスクシートを張り合わせたものにおいて、マスクシート切り欠き部分である。このマスクシートにより電極面積を規定することができる。

【0030】

このようにして得られた物の上に、上記スペーサシート、カバーシートの順に張り合わせる。それから、センサチップ形状に打ち抜く。

【0031】

【実施例】

まず、実施例における測定原理を説明する。

【0032】

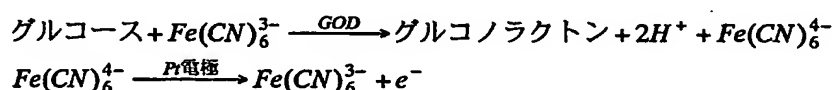
実施例における測定系は、使い捨てのセンサチップと測定機本体から構成され、酵素電極法を用いた。

【0033】

本測定の反応は下記の式で表される。

【0034】

【化1】



【0035】

血液中のグルコースがグルコース酸化酵素(GOD)によって酸化されグルコノラクトンが生成する。このとき受容体であるヘキサシアノ鉄(III)カリウム(フェリシアン化カリウム)は還元され、ヘキサシアノ鉄(II)(フェロシアン化)イオンが生成する。フェロシアン化イオンは通電された白金電極近傍でフェリシアン化イオンに酸化され、電子が発生する。この発生電子を電流値とし、グルコース濃度に換算する。

【0036】

実施例1(a) センサ構造部材の準備

ポリイミドシート上に白金をスパッタリングした。該ポリイミドシートの裏面に熱融着材料であるエチレン酢酸ビニル(EVA)をコーティングした。該多層シートを細断しテープ状にした。これを白金電極テープとする。ポリエステル系のホットメルト接着剤シートに、センサチップ反応部の電極面積を規制するよう

な空孔を打ち抜いてマスクシートとした。絶縁性材料である白色PETシートに白金電極テープ、マスクシートを熱接着した。PET層（厚さ100 μm ）の両面にアクリル系粘着剤層（厚さ25 μm ）を持つ両面粘着性シートに試料吸入室を設けるような空孔を打ち抜いてスペーサシートを作った。

【0037】

(b) 反応層塗布液の調製

セオラスクリーム（旭化成製セオラスクリームFP-03、結晶セルロース10%混合液（水溶媒））100 gを蒸留水150 gに加え、ホモジナイザーで10000 rpm、15分間攪拌した。これをセオラスクリーム希釈液とする。

【0038】

グルコースオキシダーゼ（東洋紡績製、活性165ユニット(u)/mg）2.44 g及びフェリシアン化カリウム（ナカライテクス製、特級）40 gを上記セオラスクリーム希釈液に加え、マグネチックスターラにて500 rpm、15分間攪拌した。これをA液とする。

【0039】

エチレングリコールモノエチルエーテル（ナカライテクス製、特級）100 mLをマグネチックスターラで500 rpmで攪拌しながら、上記A液100 mLを静かに滴下する。A液全量を滴下してから5分間攪拌した。これをB液とする。このようにして得られたB液を反応層塗布液とする。

【0040】

(c) 反応層塗布液の塗布乾燥

(a) の電極テープおよびマスクシートを貼りあわせたベースシート上のマスクシート切り欠き部分に、ピペットを用いて、(b) で得られた反応層塗布液を1 μL 塗布した。

【0041】

上記ベースシートを10分間オープンに入れ乾燥させる。乾燥後、反応層が形成された。

【0042】

(d) センサチップ形成

(c) で得られたベースシート上に、(a) で得られたスペーサシート、カバーシートの順に貼りあわせた。センサチップ形状に打ち抜いて、センサチップを10個形成した。その反応層表面状態の電子顕微鏡写真を図4に示す。

【0043】

(e) 測定

上記(d) で得られたセンサチップを用いて、次のような測定を行った。

【0044】

センサチップの反応層がサンプル液に溶解したとき流れる誘導電流を測定し、センサチップの溶解性を評価した。つまり、10個のセンサチップについてファラデー電流値を測定し、溶解性を評価したところ、平均160.1だった(表1、図5)。

【0045】

また、センサ出力を調べたところ、測定時間(20秒)でのグルコース濃度100 mg/dLにおける出力感度は154.7だった(表2、図6)。

【0046】

センサチップ個体間の出力ばらつきについて測定したところ、CV値は3%であった(表2、図6)。ここでいうCV値は、(センサ出力の標準偏差値/センサ出力の平均値) x 100の値である。

【0047】

比較例1

実施例1と同様に溶液Aを作った。この溶液Aを反応層塗布液とすること以外は、実施例1と同様にセンサチップを10個形成した。その反応層表面状態の電子顕微鏡写真を図3に示す。

【0048】

実施例1と同様に、ファラデー電流値を測定することにより、10個のセンサチップについて溶解性を評価したところ、平均17.6だった(表1、図5)。

【0049】

測定時間30秒でのグルコース濃度100 mg/dLにおける出力感度は、99.2だった(表2、図6)。

【0050】

センサチップ個体間の出力ばらつきについて測定したところ、CV値は10%であった(表2、図6)。

【0051】

図5を見て分かるように、実施例1のセンサチップに比べ、比較例1のセンサチップにおいて、反応層の溶解度が非常に低かった。

【0052】

また、図6を見て分かるように、比較例1におけるセンサチップは、実施例1のものに比べセンサ出力がより低く、より信頼性の低いセンサチップであることが分かる。また、比較例1におけるセンサチップにおける出力のばらつきは、実施例1のものよりも大きかった。

【0053】

【表1】

ファラデー電流値の比較

	実施例 1	比較例 1
1	156	12
2	155	19
3	159	25
4	168	18
5	152	15
6	155	20
7	166	16
8	170	18
9	162	17
10	158	16
平均値	160.10	17.60
CV値 (%)	3.83	19.72
標準偏差	6.14	3.47
MAX	170	25
MIN	152	12
最大-平均	9.90	7.40
平均-最小	8.10	5.60

【0054】

【表 2】

センサ出力の比較

	実施例 1	比較例 1
1	156	94
2	149	114
3	159	100
4	151	89
5	152	104
6	155	101
7	148	105
8	160	92
9	162	83
10	155	110
平均値	154.70	99.20
CV値 (%)	3.05	9.75
標準偏差	4.72	9.67
MAX	162	114
MIN	148	83
最大-平均	7.30	14.80
平均-最小	6.70	16.20

【0055】

【発明の効果】

本発明により、バイオセンサの試料への溶解性を、析出法を用いずに作ったバイオセンサに比べ大幅に向上することができる。また、試料への溶解性向上により、測定時間を短縮することができる。

【0056】

また、本発明により、センサ出力が高く、測定精度の高いバイオセンサを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、センサチップ構成図を示す。

【図 2】

図 2 は、反応層の概念図を示す。

【図 3】

図 3 は、比較例 1 における反応層表面状態の電子顕微鏡写真のコピーを示す。

【図 4】

図 4 は、実施例 1 における反応層表面状態の電子顕微鏡写真のコピーを示す。

【図 5】

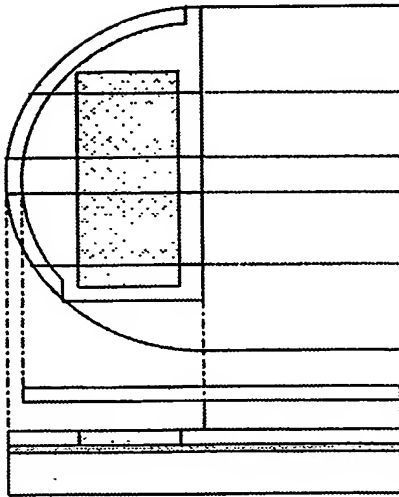
図 5 は、実施例 1 および比較例 1 におけるファラデー電流値の比較を表す図である。

【図 6】

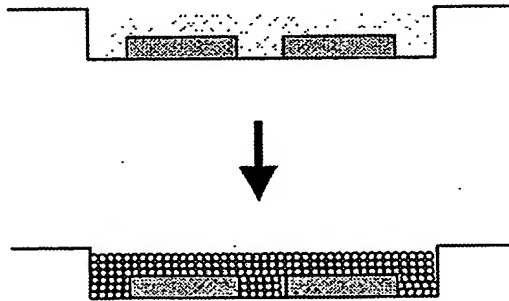
図 6 は、実施例 1 および比較例 1 におけるセンサ出力の比較を表す図である。

【書類名】 図面

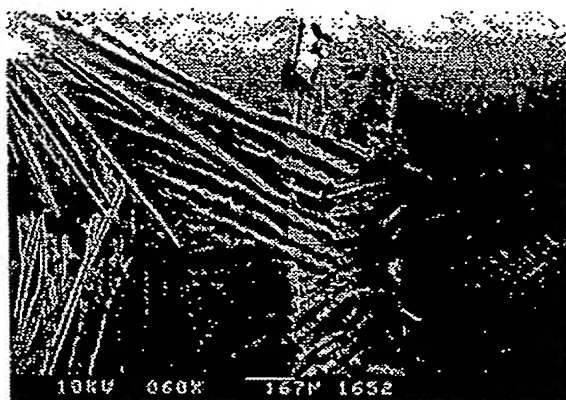
【図 1】



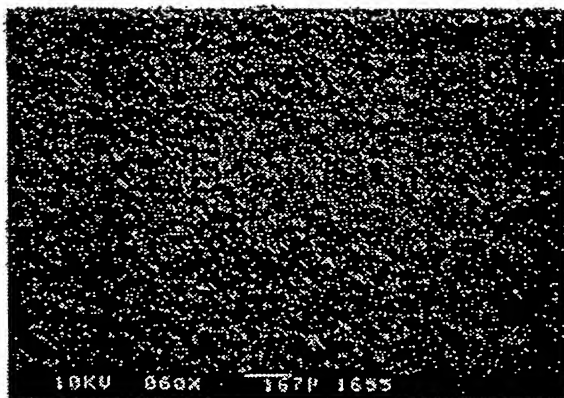
【図 2】



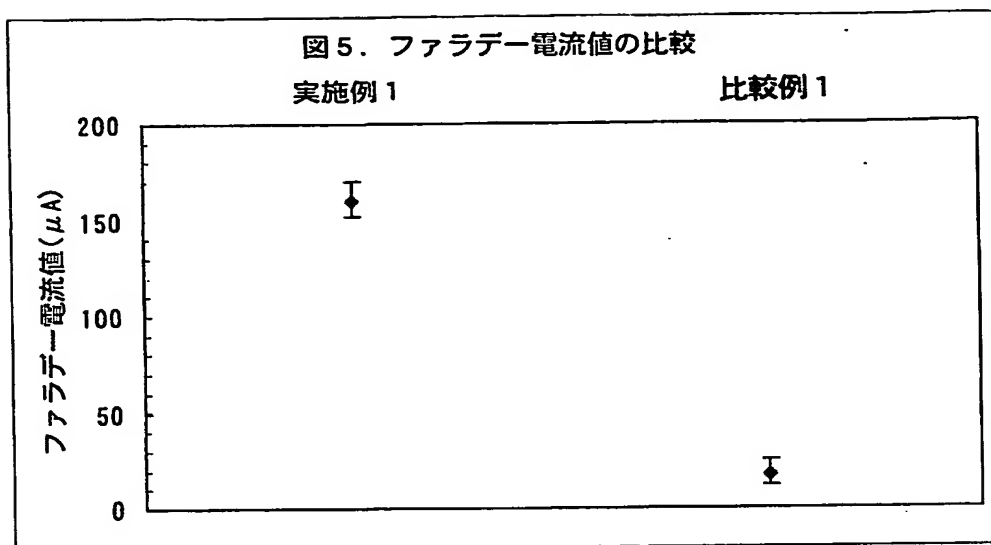
【図 3】



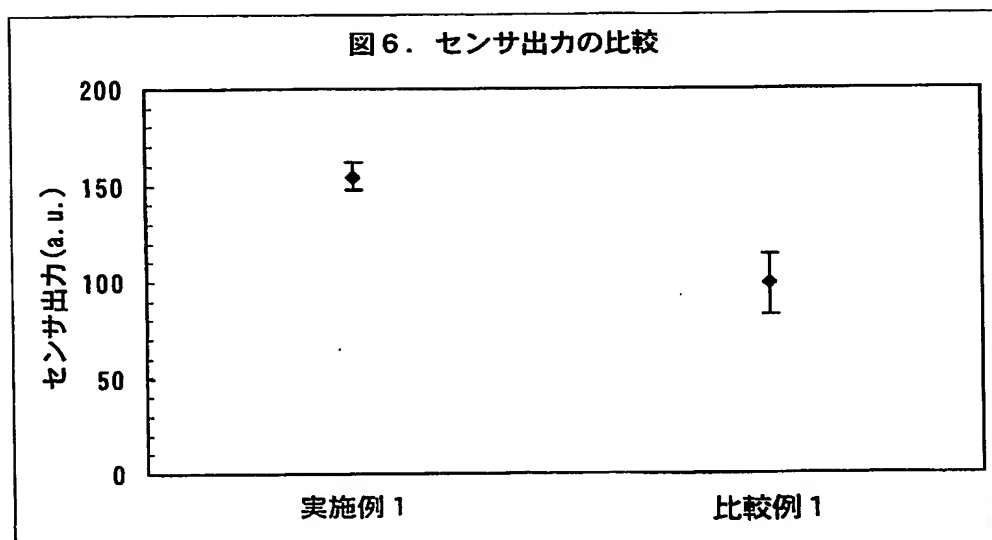
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、試料中の特定成分について迅速かつ高精度な定量分析を実施するためのバイオセンサを提供することにある。

【解決手段】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた作用極と参照極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素、電子受容体を含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系が前記電極系上または近傍に、単独又は複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、
前記反応層を形成する工程が、

- (1) 前記反応試薬系を前記反応試薬系の良溶媒に加え、溶液Aを作成する工程
 - (2) 前記溶液Aを前記反応試薬系の貧溶媒に混合し、懸濁液Bを作成する工程
 - (3) 前記懸濁液Bを電極系の所定部分に供給した後、乾燥して電極系の所定部分に反応層を密着固定する工程
- を含むバイオセンサの製造方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 3 5 6 9 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 3 3 9]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 0 年 8 月 8 日

新規登録

住 所
氏 名

京都府綾部市青野町膳所 1 番地
ゲンゼ株式会社

特願 2 0 0 2 - 2 3 5 6 9 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.